

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620060153312

UDC _____

厦门大学

博 士 学 位 论 文

孤儿受体 Nur77 及相关化合物抑制肿瘤生长 和调控糖代谢的信号通路

Signaling transduction pathways of orphan receptor Nur77
and related compounds in inhibition of tumor growth
and regulation of glucose metabolism

占 艳 艳

指导教师姓名: 吴 乔 教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2010 年 09 月

论文答辩时间: 2010 年 10 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2010 年 10 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为吴乔教授课题组的研究成果,获得吴乔教授课题组经费的资助,在吴乔教授实验室完成。

声明人(签名): 占艳艳

2010 年 10 月 25 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ☒ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 2012 年 10 月 30 日解密，解密后适用上述授权。

（ ☐ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：占艳艳

2010 年 10 月 25 日

中文摘要.....	1
英文摘要.....	4
第一章 核受体与核孤儿受体 Nur77 概述	7
1.1 核受体.....	7
1.1.1 核受体的分类.....	7
1.1.2 核受体的结构功能域.....	10
1.1.2.1 A/B 区	10
1.1.2.2 C 区	10
1.1.2.3 D 区	11
1.1.2.4 E 区	11
1.1.2.5 F 区.....	12
1.1.3 核受体的作用机制.....	12
1.1.3.1 核受体的作用元件	12
1.1.3.2 核受体的作用机制	13
1.1.3.3 核受体的辅调节因子.....	15
1.2 核受体的配体.....	21
1.2.1 核受体的配体及其功能.....	21
1.2.2 核受体配体在疾病治疗中的应用.....	21
1.2.2.1 视黄酸受体（RAR）和视黄素 X 受体（RXR）的配体	21
1.2.2.2 过氧化物酶体增殖物激活受体（PPAR）配体.....	22
1.2.2.3 激素受体的配体	23
1.3 孤儿受体.....	24
1.4 孤儿受体 Nur77	24
1.4.1 Nur77 的发现	25
1.4.2 Nur77 的组织分布	25
1.4.3 Nur77 的结构	26

1.4.4 Nur77 调控基因表达	27
1.4.4.1 Nur77 与应答元件的结合	27
1.4.4.2 Nur77 的下游靶基因	28
1.4.5 Nur77 的生物学功能	29
1.4.5.1 细胞增殖	29
1.4.5.2 细胞凋亡	30
1.4.5.3 内分泌	32
1.4.5.4 代谢	33
1.4.5.5 血管生成	34
1.4.5.6 炎症反应	35
1.4.5.7 蛋白的翻译后修饰	35
1.4.6 Nur77 的调控途径	36
1.4.6.1 表达水平的调控	36
1.4.6.2 翻译后修饰的调控	38
1.5 本论文研究的目的、思路和意义	39
参 考 文 献	42
第二章 核孤儿受体 Nur77 激动剂 Cytosporone B 的作用机制和生物学功能	58
2.1 前 言	58
2.1.1 Nur77 LBD 区的结构特征及其配体存在的可能性	58
2.1.2 核受体配体的来源	59
2.1.2.1 天然产物	59
2.1.2.2 合成化合物	60
2.1.3 核受体配体的筛选和验证方法	61
2.1.3.1 基于配体-核受体相互结合的化学生物学技术	61
2.1.3.2 基于配体对核受体的激活/抑制能力的细胞分子生物学技术	68

2.1.4 本章节的研究目的和科学意义.....	69
2.2 材 料 与 方 法.....	70
2.2.1 实验试剂和器材.....	70
2.2.1.1 化合物来源.....	70
2.2.1.2 主要试剂.....	70
2.2.1.3 主要仪器耗材.....	70
2.2.1.4 细胞株.....	71
2.2.1.5 菌株.....	72
2.2.1.6 质粒载体.....	72
2.2.1.7 实验小鼠.....	72
2.2.2 实验方法.....	72
2.2.2.1.大肠杆菌感受态制备.....	72
2.2.2.2 质粒转化.....	73
2.2.2.3 质粒提取.....	73
2.2.2.4 表达质粒的构建.....	75
2.2.2.5 GST 融合蛋白的表达与纯化.....	76
2.2.2.6 化合物与蛋白质相互作用分析.....	77
2.2.2.7 细胞培养.....	79
2.2.2.8 药物处理.....	80
2.2.2.9 细胞转染.....	80
2.2.2.10 荧光素酶活性测定实验.....	80
2.2.2.11 蛋白提取与 Western blot.....	82
2.2.2.12 线粒体分离.....	84
2.2.2.13 凝胶阻滞实验.....	84
2.2.2.14 GST 沉淀实验.....	85
2.2.2.15 染色质免疫共沉淀.....	86
2.2.2.16 细胞免疫荧光染色和观察.....	87
2.2.2.17 细胞凋亡分析.....	87

2.2.2.18 MTT 法测定细胞生长抑制.....	88
2.2.2.19 裸鼠移植瘤实验.....	89
2.2.2.20 总 RNA 提取与实时荧光 PCR.....	89
2.2.2.21 小鼠血糖实验.....	90
2.2.2.22 数据的统计学处理.....	91
2.3 结果与分析.....	92
2.3.1 应用转录激活模型筛选 Nur77 激动剂.....	92
2.3.2 各种实验方法验证 Csn-B 直接与 Nur77 结合.....	93
2.3.3 Nur77 配体结合区是 Csn-B 结合的关键区域.....	100
2.3.4 Y453 是 Csn-B 与 Nur77 结合的关键位点.....	104
2.3.5 Csn-B 提高 Nur77 的转录激活活性.....	109
2.3.6 Nur77 存在转录自调控.....	114
2.3.7 Csn-B 促进转录辅激活因子的募集.....	117
2.3.8 Csn-B 通过诱导糖异生基因表达提高血糖水平.....	119
2.3.9 Csn-B 通过促进 Nur77 定位到线粒体诱导细胞凋亡.....	125
2.3.10 Csn-B 抑制肿瘤细胞增殖和裸鼠移植瘤生长.....	131
2.4 讨 论.....	136
参 考 文 献.....	139
第三章 通过 Nur77-LKB1 介导的调节糖代谢的分子机制和信号通路.144	
3.1 前 言.....	144
3.1.1 AMPK 的发现.....	144
3.1.2 AMPK 的构成与组织分布.....	144
3.1.3 AMPK 各亚基的结构与功能.....	145
3.1.4 AMPK 的上游激酶及活性调控.....	146
3.1.4.1 AMPK 的上游激酶.....	146
3.1.4.2 AMPK 的活性调控.....	147

3.1.5 AMPK 的生物学功能	147
3.1.5.1 AMPK 对摄食的影响.....	149
3.1.5.2 AMPK 对糖代谢的调控.....	150
3.1.6 本章节的研究目的、思路和意义.....	155
3.2 材 料 与 方 法.....	157
3.2.1 实验试剂和器材.....	157
3.2.1.1 主要试剂.....	157
3.2.1.2 化合物来源.....	157
3.2.1.3 主要仪器耗材.....	157
3.2.1.4 细胞株.....	157
3.2.1.5 菌株.....	158
3.2.1.6 质粒载体.....	158
3.2.1.7 实验小鼠.....	158
3.2.2 实验方法.....	158
3.2.2.1 药物处理.....	158
3.2.2.2 免疫沉淀实验.....	158
3.2.2.3 体外结合实验.....	159
3.2.2.4 体外磷酸化实验.....	159
3.2.2.5 II 型糖尿病小鼠模型实验.....	160
3.2.2.6 SPZ 处理小鼠血糖实验.....	160
3.2.2.7 组织蛋白提取与 Western blot.....	161
3.2.2.8 总 RNA 提取和荧光定量 PCR.....	161
3.2.2.9 数据的统计学处理.....	161
3.3 结 果 与 分 析.....	162
3.3.1 Nur77 抑制 AMPK α 的磷酸化.....	162
3.3.2 LKB1 介导 Nur77 抑制的 AMPK α 磷酸化.....	164
3.3.3 Nur77 与 AMPK α 竞争结合 LKB1.....	167

3.3.4 TMPA 通过靶向 Nur77 提高 AMPK α 的磷酸化	173
3.3.5 Q388, H394 和 Q474 是 Nur77 与 TMPA 结合的关键位点	182
3.3.6 TMPA 降低 II 型糖尿病小鼠的血糖水平	187
3.4 讨 论	194
参 考 文 献	196
在学期间发表的论文	200
致 谢	201

Abstract in Chinese.....	1
Abstract in English.....	4
Chapter 1. Overview of nuclear receptors and orphan receptor Nur77	7
1.1 Nuclear receptors	7
1.1.1 Classification of Nuclear receptors	7
1.1.2 Structure and functional doamin of Nuclear receptors	10
1.1.2.1 A/B region	10
1.1.2.2 C region	10
1.1.2.3 D region.....	11
1.1.2.4 E region	11
1.1.2.5 F region.....	12
1.1.3 Mechanism of action of nuclear receptors	12
1.1.3.1 Hormone response elements.....	12
1.1.3.2 Mechanism of action of nuclear receptors.....	13
1.1.3.3 Nuclear Receptor Cofactors	15
1.2 Ligands of nuclear receptors.....	21
1.2.1 Function of Ligands	21
1.2.2 Application of ligands in the treatment of diseases	21
1.2.2.1 Ligands of RAR and RXR.....	21
1.2.2.2 Ligands of PPAR	22
1.2.2.3 Ligands of hormone receptors	23
1.3 Orphan receptors.....	24
1.4 Orphan receptor Nur77	24
1.4.1 Identification of Nur77	25
1.4.2 Expression of Nur77 in various tissues.....	25
1.4.3 Structure domain of Nur77	26

1.4.4 Regulation of gene expression by Nur77	27
1.4.4.1 Nur77 targeting to its response element	27
1.4.4.2 Target genes of Nur77	28
1.4.5 Biological function of Nur77	29
1.4.5.1 Cell proliferation	29
1.4.5.2 Cell apoptosis	30
1.4.5.3 Endocrine.....	32
1.4.5.4 Metabolism.....	33
1.4.5.5 Angiogenesis	34
1.4.5.6 Inflammation	35
1.4.5.7 Post-translation modification of protein	35
1.4.6 Regulation of Nur77	36
1.4.6.1 Regulation of Nur77 expression	36
1.4.6.2 Post-translation modification of Nur77	38
1.5 Purpose, idea and significance of this thesis	39
References	42
Chapter 2. The mechanism and biological functions of Cytosporone B, an agonist for nuclear orphan receptor Nur77	58
2.1 Introduction.....	58
2.1.1 Structure of the ligand binding domain of Nur77 and the possibility of its ligand or agonist existed	58
2.1.2 Source of ligands of nuclear receptors.....	59
2.1.2.1 Natural products	59
2.1.2.2 Synthetic compounds.....	60
2.1.3 Screening and verifying methods for ligands	61
2.1.3.1 Chemical biology methods based on ligand-receptor interaction.....	61

2.1.3.2 Cellular and molecular biology methods based on activation/inhibition of receptor by ligands	68
2.1.4 Purpose and scientific significance	69
2.2 Materials and methods	70
2.2.1 Reagents and Apparatus	70
2.2.1.1 Preparation of compounds	70
2.2.1.2 chemical reagents	70
2.2.1.3 Apparatus and materials	70
2.2.1.4 Cell lines	71
2.2.1.5 Bacterial strains	72
2.2.1.6 Plasmids	72
2.2.1.7 Mice	72
2.2.2 Methods	72
2.2.2.1 Competent cells	72
2.2.2.2 Transformation	73
2.2.2.3 Plasmids extraction	73
2.2.2.4 Construction of plasmids	75
2.2.2.5 Expression and purification of GST-fusion protein	76
2.2.2.6 Analysis of compound-protein interaction	77
2.2.2.7 Cell culture	79
2.2.2.8 Drug treatment	80
2.2.2.9 Transfection	80
2.2.2.10 Luciferase assay	80
2.2.2.11 Protein preparation and Western blot	82
2.2.2.12 Mitochondria isolation	84
2.2.2.13 Electrophoretic mobility shift assay	84
2.2.2.14 GST pull down assay	85
2.2.2.15 CHIP	86

2.2.2.16 Cell immunofluorescent staining and detection	87
2.2.2.17 Analysis of cell apoptosis	87
2.2.2.18 Determination of cell growth inhibition by MTT assay	88
2.2.2.19 Xenograft tumor inhibition in nude mice	89
2.2.2.20 RNA extraction and realtime PCR.....	89
2.2.2.21 Blood glucose detection	90
2.2.2.22 Statistical analysis	91
2.3 Results and analysis	92
2.3.1 Transactivation screening modeling for agonist of Nur77.....	92
2.3.2 Csn-B binds directly with Nur77 by various methods.....	93
2.3.3 LBD of Nur77 is critical for its binding with Csn-B	100
2.3.4 Y453 is critical for the interaction of Nur77 and Csn-B.....	104
2.3.5 Csn-B stimulates transactivational activity of Nur77	109
2.3.6 Autoregulation of Nur77	114
2.3.7 Csn-B promotes the recruitment of coactivators.....	117
2.3.8 Csn-B increases blood glucose by enhancing gluconeogenic gene expression	119
2.3.9 Csn-B induces cell apoptosis by promoting Nur77 mitochondrial targeting....	125
2.3.10 Csn-B inhibits proliferation of tumor cells and growth of xenograft tumor in nude mice	131
2.4 Discussion.....	136
References	139
第三章 A novel regulatory mechanism and signaling pathway for cellular glucose metabolism mediated by the interactions between Nur77 and LKB1	144
3.1 Introduction.....	144
3.1.1 Identification of AMPK	144

3.1.2 Structure and tissue distribution of AMPK	144
3.1.3 Structure and functions of subunits of AMPK	145
3.1.4 Upstream kinases and activity regulation of AMPK	146
3.1.4.1 Upstream kinases of AMPK	146
3.1.4.2 Activity regulation of AMPK	147
3.1.5 Biological functions of AMPK	147
3.1.5.1 AMPK regulates food intakes	149
3.1.5.2 AMPK regulates glucose metabolism	150
3.1.6 Purpose, ideas and significance	155
3.2 Materials and methods	157
3.2.1 Reagents and Apparatus	157
3.2.1.1 Chemical reagents	157
3.2.1.2 Preparation of compounds	157
3.2.1.3 Apparatus and materials	157
3.2.1.4 Cell lines	157
3.2.1.5 Bacterial strains	158
3.2.1.6 Plasmids	158
3.2.1.7 Mice	158
3.2.2 Methods	158
3.2.2.1 Drug treatment	158
3.2.2.2 Immunoprecipitation	158
3.2.2.3 Binding assay in vitro	159
3.2.2.4 Phosphorylation assay in vitro	159
3.2.2.5 II type diabetic mouse model test	160
3.2.2.6 Blood glucose test in SPZ-treated mice	160
3.2.2.7 Tissue protein preparation and Western blot	161
3.2.2.8 RNA extraction and realtime PCR	161
3.2.2.9 Statistics analysis	161

3.3 Results and analysis	162
3.3.1 Nur77 suppresses AMPK α phosphorylation.....	162
3.3.2 Nur77-mediated suppression of AMPK α phosphorylation is LKB1-dependent	
.....	164
3.3.3 Nur77 competes with AMPK α to bind LKB1	167
3.3.4 TMPA increases AMPK α phosphorylation through Nur77 mediation	173
3.3.5 Q388, H394 and Q474 are critical for the binding of Nur77 and TMPA	182
3.3.6 Hypoglycemic effects of TMPA in the db/db mice.....	187
3.4 Discussion	194
References	196
Publications.....	200
Acknowledgement.....	201

摘 要

第一章 核受体与核孤儿受体 Nur77 概述

核受体是一类配体依赖的转录因子。在类固醇/甲状腺激素、视黄素及类脂代谢物等配体的刺激下，核受体参与调节细胞的生长、分化、凋亡及代谢等生命活动。核受体能以单体、同源二聚体或者异源二聚体的形式结合到相应的激素应答元件上，并以配体依赖的方式募集不同的转录辅调节因子，从而调控下游靶基因的转录。核受体功能紊乱将导致一系列疾病，如癌症、糖尿病、老年痴呆、心血管疾病、不育症等，因此被认为是治疗这些疾病的重要靶点。核受体的配体能激活或抑制核受体的功能，因而具有非常重要的药物研发价值。

Nur77(也称 TR3, NGFI-B 和 NAK1)是核受体超家族的重要成员之一。虽然它在结构上具有核受体的典型特征，但至今尚未发现其配体，因此被称为核孤儿受体(nuclear orphan receptor)。Nur77 是一种立早基因，能被多种外界信号迅速诱导表达，如生长因子、凋亡因子、内分泌激素或炎症因子等，并在细胞增殖、凋亡、能量代谢及炎症等过程中发挥重要的调控作用。作为转录因子，Nur77 通过与其应答元件 NBRE 或 NurRE 的结合，调控许多基因的转录；Nur77 还可以从细胞核转运到细胞浆并定位于线粒体上，从而诱导细胞凋亡。此外，Nur77 还可以作为调控蛋白，通过与其他蛋白的相互作用来调控蛋白翻译后修饰，并影响蛋白的生物学功能。总之，Nur77 可以通过复杂的调控网络，以多种不同的作用方式发挥着各种各样的生物学功能。

总之，本章节对核受体超家族和孤儿受体 Nur77 的结构、作用机制和生物学功能进行了综述。

关键词：核受体，配体，孤儿受体 Nur77

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库